(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0173870
(43) 공개일자 2023년12월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/78 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C12P 7/62 (2022.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/78 (2013.01)
C12N 9/0006 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0074649
(22) 출원일자 2022년06월20일
심사청구일자 2022년06월20일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이은열
서울특별시 강남구 광평로34길 55 수서동 강남데시앙포레아파트 104동 802호(수서동, 강남데시앙포레아파트)
응웬 탄 린
경기도 용인시 기흥구 서그내로16번길 17, 2-2호 (서천동,진영빌라 4동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

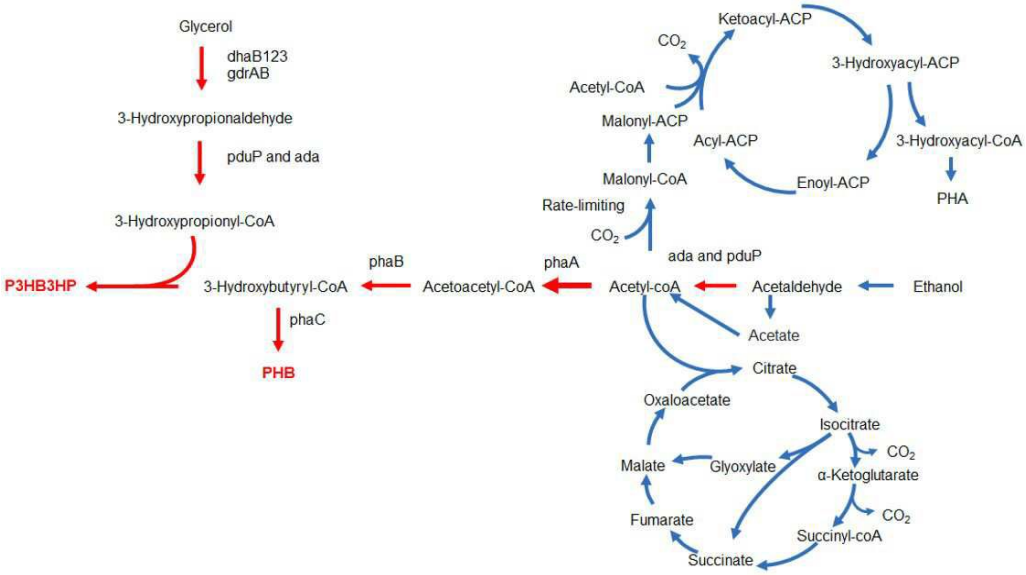
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **에탄올 및 글리세롤을 폴리하이드록시알카노에이트로 전환하기 위한 재조합 슈도모나스 푸티다 바이오촉매의 개발**

(57) 요 약

본 발명은 에탄올 및 글리세롤로부터 폴리하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체 생산능을 가지는 형질전환 재조합 미생물 및 이를 이용한 폴리하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체 생산 방법에 관한 것으로, 본 발명의 형질전환된 재조합 미생물은 바이오디젤 제조 등에서 부산물로 나오는 글리세롤을 에탄올과 함께 고부가가치화하여, 친환경적이고 경제적으로 다양한 종류의 폴리하이드록시알카노에이트 계열의 생분해성 바이오플라스틱을 제조할 수 있는 바, 친환경 바이오 소재 활용을 증대화하는데 유용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 9/0008 (2013.01)
C12N 9/1029 (2013.01)
C12P 7/62 (2022.01)

(72) 발명자
마이 호앙 둥
경기도 용인시 기흥구 서그내로16번길 17 201호(서천동, 진영빌라 4동)

아르슬란 사르와르
경기 수원시 영통구 청명로59번길 24 B03호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711157126
과제번호	2015M3D3A1A01064882
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	C1가스리파이너리사업
연구과제명	메탄-메탄올 전환 플랫폼 균주 개발(3단계 2차년도)(8/9)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2015.09.17 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenases, ada); 프로피온알데하이드 탈수소효소(propionaldehyde dehydrogenase, pduP); PHA 신타아제(polyhydroxyalkanoate synthase, phaC); 3-케토티올라제(3-ketothiolase, phaA) 및 아세토아세틸-CoA 환원효소(acetoacetyl-CoA reductase, phaB)가 도입 또는 과발현되어 폴리하이드록시부티레이트(poly(3-hydroxybutyrate)) 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 알데하이드 탈수소효소(ada)는 서열번호 1; 프로피온알데하이드 탈수소효소(pduP)는 서열번호 2; PHA 신타아제(phaC)는 서열번호 3; 3-케토티올라제(phaA)는 서열번호 4; 및 아세토아세틸-CoA 환원효소(phaB)는 서열번호 5;의 염기서열로 이루어진 유전자로 각각 코딩되는 것인, 폴리하이드록시부티레이트 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 슈도모나스속(*Pseudomonas*) 균주인 것인, 폴리하이드록시부티레이트 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 슈도모나스속 균주는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) KT2440인, 폴리하이드록시부티레이트 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 에탄올을 기질로 이용하여 폴리하이드록시부티레이트를 생산하는 것인, 폴리하이드록시부티레이트 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 에탄올을 아세트알데하이드(acetaldehyde)로 전환; 아세트알데하이드를 아세틸-CoA(acetyl-coenzyme A)로 전환; 및 아세틸-CoA를 폴리하이드록시부티레이트로 전환;하는 단계를 통해 에탄올을 폴리하이드록시부티레이트로 전환하는 것인, 폴리하이드록시부티레이트 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 재조합 미생물을 포함하는 폴리하이드록시부티레이트 생산용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 조성물은 기질로서 에탄올을 포함하는 것인, 폴리하이드록시부티레이트 생산용 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 재조합 미생물을 에탄올이 포함된 배지에서 배양하여 전환 반응을 유도하는 단계; 및

상기 배지로부터 폴리하이드록시부티레이트를 회수하는 단계;를 폴리하이드록시부티레이트의 생산 방법.

청구항 10

알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenases, ada); 프로피온알데하이드 탈수소효소(propionaldehyde dehydrogenase, pduP); 글리세롤 탈수효소(glycerol dehydratase, dhaB123+gdrA 및 gdrB); PHA 신타아제(polyhydroxyalkanoate synthase, phaC); 3-케토티올라제(3-ketothiolase, phaA) 및 아세토아세틸-CoA 환원효소(acetoacetyl-CoA reductase, phaB)가 도입 또는 과발현되어 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate, P3HB3HP) 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 알데하이드 탈수소효소(ada)는 서열번호 1; 프로피온알데하이드 탈수소효소(pduP)는 서열번호 2; PHA 신타아제(phaC)는 서열번호 3; 3-케토티올라제(phaA)는 서열번호 4; 아세토아세틸-CoA 환원효소(phaB)는 서열번호 5; 글리세롤 탈수효소(dhaB123+gdrA)는 서열번호 6; 및 글리세롤 탈수효소(gdrB)는 서열번호 7;의 염기서열로 이루어진 유전자로 각각 코딩되는 것인, 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 에탄올 및 글리세롤을 공동 기질로 이용하여 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트를 생산하는 것인, 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 에탄올을 아세트알데하이드로 전환; 아세트알데하이드를 아세틸-CoA로 전환; 및 아세틸-CoA를 3-하이드록시부틸-CoA로 전환;하는 단계;

글리세롤을 3-하이드록시프로피온알데하이드(3-hydroxypropionaldehyde)로 전환; 3-하이드록시프로피온알데하이드를 3-하이드록시프로피오닐-CoA(3-hydroxypropionyl-CoA)로 전환 하는 단계; 및

3-하이드록시부틸-CoA 및 3-하이드록시프로피오닐-CoA를 중합하는 단계;를 통해 에탄올 및 글리세롤로부터 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체를 중합하는 것인, 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 14

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항의 재조합 미생물을 포함하는 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체 생산용 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 조성물은 기질로서 에탄올 및 글리세롤을 포함하는 것인, 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체 생산용 조성물.

청구항 16

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항의 재조합 미생물을 에탄올 및 글리세롤이 포함된 배지에서 배양하여 전환 반응을 유도하는 단계; 및

상기 배지로부터 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체를 회수하는 단계;를 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체의 생산 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 에탄올 및 글리세롤로부터 폴리하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체 생산능을 가지는 형질전환 재조합 미생물 및 이를 이용한 폴리하이드록시부티레이트 및 3-하

이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체 생산 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 미생물 촉매를 이용한 재생 가능한 탄소 공급원료의 사용에 대한 연구가 많은 관심을 받고 있다. 탄소 공급원료 중 하나인 에탄올은 미생물 생산을 위한 화학물질 및 연료의 대체 역할을 할수 있는 탄소 기질로 개발되고 있다. 특히, 에탄올은 아세틸-CoA 유래 산물(acetyl-CoA-derived products)을 위한 유망한 탄소 기질로 알려져 있으며, 이는 에탄올이 간단한 효소 단계를 가지며, 아세틸-CoA로 전환되는 동안 2개의 NADH 분자를 생성하고, 포도당이나 글리세롤의 경우처럼 아세틸-CoA로 전환되는 동안 나타나는 CO_2 손실이 없기 때문에 아세틸-CoA 유래 산물 생산에 유리하다.

[0003] 폴리하이드록시알카노에이트(Polyhydroxyalkanoates, PHA)는 재조합 대장균 또는 *Ralstonia eutropha*에 의해 산업적으로 생산되는 생분해성 폴리에스테르(생분해성 바이오플라스틱)이다. 최근 연구에 따르면 *Methylocystis hirsuta* 또는 *cyanobacteria*를 이용하여 메탄 또는 CO_2로부터 폴리하이드록시알카노에이트 생산이 보고되고 있다. 폴리하이드록시부티레이트(poly(3-hydroxybutyrate), PHB)는 많은 종류의 미생물에서 가장 많이 연구된 바이오플라스틱이다.

[0004] 한편, Narancic et al. (2018)은 최근에 가정, 산업용 처리시설, 토양, 해수 등의 환경에서 다양한 종류의 폴리머(polymer) 기반의 플라스틱이 분해에 소요되는 시간을 측정하였고, 생분해성 플라스틱이라도 종류에 따라 분해 정도가 상당한 차이가 있음을 보고하였다. 우리의 실생활에서 널리 사용되는 폴리머인 'Poly lactic acid (PLA)'의 경우 높은 온도의 산업용 처리시설에서는 분해되었으나 실온에서 쉽게 분해되지 않았고, PHB는 가정, 산업용 처리시설뿐 아니라 담수와 해수에서도 완전히 분해되었다. 이러한 결과는 어떠한 종류의 polymer 유래 생분해성 플라스틱을 개발하고 사용해야 하는지를 시사한다.

[0005] 3-하이드록시부티레이트의 호모중합체인 3-하이드록시부티레이트 공중합체(폴리하이드록시부티레이트, poly(3-hydroxybutyrate, 3HB))는 자연에서 가장 풍부한 폴리머이며, 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시발레레이트 공중합체(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), P3HB3HV), 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시헥사노에이트 공중합체(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate), P3HB3HH), 및 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate), P3HB3HP)는 3HB보다 훨씬 유연하고 결정성이 적다. 이들 co-polymer 중에서, 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체 (P3HB3HP)는 물질 특성의 장점으로 인해 생분해성 플라스틱의 재료로 매우 유망하다. 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체는 E.coli, Ralstonia, Pseudomonas와 같은 미생물에 의해 합성 가능하며 포도당, 오탄당, 및 글리세롤과 같은 탄소원으로부터 생산되어 왔다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국공개특허 제10-2021-0048625호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 폴리하이드록시부티레이트(poly(3-hydroxybutyrate)) 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 폴리하이드록시부티레이트 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 폴리하이드록시부티레이트의 생산 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate, P3HB3HP) 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체 생산용 조성물을 제공하

는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체의 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0015] 본 발명은 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenases, ada); 프로피온알데하이드 탈수소효소(propionaldehyde dehydrogenase, pduP); PHA 신타아제(polyhydroxyalkanoate synthase, phaC); 3-케토티올라제(3-ketothiolase, phaA) 및 아세토아세틸-CoA 환원효소(acetoacetyl-CoA reductase, phaB)가 도입 또는 과발현되어 폴리하이드록시부티레이트(poly(3-hydroxybutyrate), PHB) 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다.

[0016] 일 구현예에 있어서, 상기 PHB 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물은 슈도모나스속(*Pseudomonas*) 균주일 수 있고, 바람직하게는, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) KT2440일 수 있다.

[0017] 일 구현예에 있어서, 상기 PHB 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물은 에탄올을 기질로 이용하여 폴리하이드록시부티레이트를 생산하는 것일 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 PHB 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물을 포함하는 폴리하이드록시부티레이트 생산용 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 PHB 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물을 에탄올이 포함된 배지에서 배양하여 전환 반응을 유도하는 단계; 및 상기 배지로부터 폴리하이드록시부티레이트를 회수하는 단계;를 폴리하이드록시부티레이트의 생산 방법을 제공한다.

[0020] 나아가, 본 발명은 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenases, ada); 프로피온알데하이드 탈수소효소(propionaldehyde dehydrogenase, pduP); 글리세롤 탈수효소(glycerol dehydratase, dhaB123+gdrA 및 gdrB); PHA 신타아제(polyhydroxyalkanoate synthase, phaC); 3-케토티올라제(3-ketothiolase, phaA) 및 아세토아세틸-CoA 환원효소(acetoacetyl-CoA reductase, phaB)가 도입 또는 과발현되어 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate, P3HB3HP) 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다.

[0021] 일 구현예에 있어서, 상기 P3HB3HP 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물은 슈도모나스속(*Pseudomonas*) 균주일 수 있고, 바람직하게는, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) KT2440일 수 있다.

[0022] 일 구현예에 있어서, 상기 P3HB3HP 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물은 에탄올 및 글리세롤을 공동 기질로 이용하여 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트를 생산하는 것일 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 P3HB3HP 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물을 포함하는 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체 생산용 조성물을 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 P3HB3HP 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물을 에탄올 및 글리세롤이 포함된 배지에서 배양하여 전환 반응을 유도하는 단계; 및 상기 배지로부터 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체를 회수하는 단계;를 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체의 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0026] 본 발명은 에탄올 및 글리세롤로부터 폴리하이드록시부티레이트 및 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물인 재조합 슈도모나스 푸티다(*P. putida*) KT2440 균주에 관한 것으로, 본 발명의 재조합 *P. putida* KT2440 균주는 기질로서 에탄올을 공급하여 높은 폴리하이드록시부티레이트(PHB) 생산(최대9.3±0.56 g/L) 및 에탄올과 글리세롤을 함께 공급하여 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체 생산이 가능한 효과가 있다. 따라서, 본 발명의 상기 형질전환된 재조합

미생물은 바이오디젤 제조 등에서 부산물로 나오는 글리세롤과 에탄올을 함께 고부가가치화하여, 친환경적이고 경제적으로 다양한 종류의 폴리하이드록시알카노에이트 계열의 생분해성 바이오플라스틱을 제조할 수 있는 바, 친환경 바이오 소재 활용을 증대화하는데 유용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 본 발명의 슈도모나스 푸티다(*P. putida*) KT2440 균주에서 짧은 사슬 길이의 폴리하이드록시알카노에이트(PHA) 생산 경로를 재구성하여 나타낸 모식도이다: 빨간색 화살표는 과발현되는 효소를 의미한다.

도 2는 다양한 농도의 에탄올에서 배양 시간에 따른 *P. putida* KT2440의 성장 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 3은 에탄올에서 성장하는 동안 *P. putida* KT2440에서 pAWP89-MCS2 및 pBBR1-MCS2 플라스미드(a 및 b) 및 내인성 프로모터(c, d 및 e)의 발현 강도를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 폴리하이드록시부티레이트(PHB) 생산을 위한 재조합 균주 *P. putida* KT2440에 대하여 (a) 에탄올로부터 PHB 생산에 대한 재구성 경로를 나타낸 모식도; (b) 재조합 균주에 포함된 플라스미드를 나타낸 모식도; (c) 재조합 균주의 성장 곡선, 에탄올 소비, 및 아세테이트 형성을 나타낸 그래프; 및 (d) 생산된 PHB 역가(tifter)를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 재조합 균주 KT-pBBR1-pTacCABpa에 대하여 (a) 에탄올 또는 포도당으로부터 PHB 생산 경로를 나타낸 모식도; (b) 1% 에탄올 및 0.8% 포도당에서 재조합 균주의 성장 곡선을 나타낸 그래프; 및 (c) 1% 에탄올 및 0.8% 포도당에서 재조합 균주에 의해 생산된 PHB 역가, PHB 수율 및 DCW 수율을 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명의 재조합 균주 *P. putida* KT2440을 사용하여 모델 공중합체로 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-3-하이드록시프로피오네이트)(P3HB3HP)의 생산에 대한 효과를 분석한 결과이다: (a) 2-모듈 시스템에 의한 공중합체 p3HB3HP 생산 경로를 간략히 나타낸 모식도; (b) 2-모듈 시스템 플라스미드(플라스미드 pAWP89-dg 및 pBBR1-pTacCABpa)를 나타낸 모식도; (c) 재조합 균주 KT-pAWP89-dg의 비타민 B12 존재 또는 부존재에 따른 성장 곡선을 나타낸 그래프; (d) 재조합 균주 KT-pAWP89-dg에 의한 비타민 B12 존재 또는 부존재에 따른 3HP 생산량을 나타낸 그래프; 및 (e) 플라스미드 pAWP89-dg 및 pBBR1-pTacCABpa를 넣은 재조합 *P. putida* KT2440를 이용한 P3HB3HP 생산을 나타낸 그래프.

도 7은 생물 반응기에 의한 본 발명의 재조합 균주 *P. putida* KT2440의 PHB 생산을 분석한 결과를 나타낸 것이다: (a) 재조합 균주의 성장 곡선, 에탄올 소비 및 3HB 생산을 나타낸 그래프; (b) 재조합 균주에 의한 PHB의 역가, PHB 수율 및 DCW 수율을 나타낸 그래프; (c) 재조합 균주에 포함된 플라스미드를 나타낸 모식도; 및 (d) 생물반응기 시스템을 촬영한 이미지.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0030] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0031] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0033] 일 측면에서, 본 발명은 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenases, ada); 프로피온알데하이드 탈수소효소(propionaldehyde dehydrogenase, pduP); PHA 신타아제(polyhydroxyalkanoate synthase, phaC); 3-케토티올

라제(3-ketothiolase, phaA) 및 아세토아세틸-CoA 환원효소(acetoacetyl-CoA reductase, phaB)가 도입 또는 과발현되어 폴리하이드록시부티레이트(poly(3-hydroxybutyrate), PHB) 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물에 관한 것이다.

[0034] 본 발명에서 용어, "폴리하이드록시부티레이트 (Poly(3-hydroxybytyrate), PHB)"는 폴리하이드록시알카노에이트(PHA)의 한 종류로서, 생분해성 폴리에스터인 폴리 3-하이드록시부티레이트(3HB)를 의미한다.

[0035] 본 발명의 용어, "미생물"은 조류(algae), 세균류(bacteria), 원생동물류(protozoa), 사상균류(fungi), 효모류(yeast)와 한계적 생물이라고 할 수 있는 바이러스(virus) 등이 이에 속한다. 최소 생활단위임에 따라 생명을 유지하기 위한 최소한의 대사과정을 수행하고 있으며, 이러한 대사과정에 유전공학적인 방법을 이용하여 특정 대사과정을 촉진 또는 저해하거나 하는 방법으로 원하는 방향으로 조절할 수 있다.

[0036] 본 발명에서 용어, "형질전환된 재조합 미생물"은 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 벡터를 이용하여 숙주의 내부로 도입된 후, 상기 목적 단백질을 발현시키도록 변이된 세포 또는 미생물을 의미한다. 이때, 상기 숙주세포에 도입되는 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 한, 어떠한 형태라도 무방하다.

[0037] 본 발명에서 용어 "재조합 미생물"은 본 발명에서 형질전환의 대상이 되는 숙주 균주를 의미할 수 있으며, 본 발명의 목적상 에탄올을 탄소원(기질)으로 사용하여, 최종적으로 폴리하이드록시부티레이트를 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0038] 일 구현예에 있어서, 상기 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenases, ada)는 아세트알데하이드를 아세틸-CoA로 직접 전환하는 촉매 작용을 하는 효소를 의미한다. 상기 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenases)를 코딩하는 유전자(ada)는 딕케야 지애(*Dickeya zeae*) 유래일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 1의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 1의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 알데하이드 탈수소효소 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.

[0039] 일 구현예에 있어서, 상기 프로피온알데하이드 탈수소효소(propionaldehyde dehydrogenase, pduP)는 3-프로피온알데하이드를 3-프로피오닐-CoA로 촉매하는 작용을 하는 효소를 의미하며, 아세트알데하이드를 아세틸-CoA로 전환하는 촉매 작용을 수행할 수 있다. 상기 프로피온알데하이드 탈수소효소(propionaldehyde dehydrogenase)를 코딩하는 유전자(pduP)는 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) KCTC 2442 유래일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 2의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 2의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 알데하이드 탈수소효소 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.

[0040] 일 구현예에 있어서, 상기 PHA 신타아제(polyhydroxyalkanoate synthase, phaC)는 3-하이드록시부티릴-CoA를 폴리하이드록시부티레이트로 전환하는 촉매작용을 하는 효소일 수 있고, 3-케토티올라제(3-ketothiolase, phaA)는 아세토아세틸-CoA를 3-하이드록시부티릴-CoA로 전환하는 촉매작용을 하는 효소일 수 있으며, 아세토아세틸-CoA 환원효소(acetoacetyl-CoA reductase, phaB)는 아세틸-CoA를 아세토아세틸-CoA로 전환하는 촉매작용을 하는 효소일 수 있다. 구체적으로 상기 PHA 신타아제(polyhydroxyalkanoate synthase); 3-케토티올라제(3-ketothiolase) 및 아세토아세틸-CoA 환원효소(acetoacetyl-CoA reductase)를 코딩하는 유전자인 phaC, phaA 및 phaB는 큐프리아비두스 네카토르(*Cupriavidus necator*) H16 유래일 수 있으며, 각각 서열번호 3, 서열번호 4 및 서열번호 5의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 3, 서열번호 4 및 서열번호 5의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 phaC, phaA 및 phaB 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.

[0041] 즉, 본 발명의 폴리하이드록시부티레이트(PHB) 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물에 있어서, 상기 알데하이드 탈수소효소(ada)는 서열번호 1; 프로피온알데하이드 탈수소효소(pduP)는 서열번호 2; PHA 신타아제(phaC)는 서열번호 3; 3-케토티올라제(phaA)는 서열번호 4; 및 아세토아세틸-CoA 환원효소(phaB)는 서열번호 5;의 염기서열로 이루어진 유전자로 각각 코딩되는 것일 수 있다.

[0042] 상기 언급한 각각의 효소 또는 단백질은 본 발명에서 사용되는 각각의 활성을 나타내는 한, 각 효소 또는 단백

질을 구성하는 아미노산 서열의 하나 이상의 위치에서의 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실, 삽입, 첨가 또는 역위된 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 상기 각 효소 또는 단백질의 활성을 나타내는 한, 상기 각 효소 또는 단백질의 아미노산 서열에 대하여, 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 보다 더 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 가지는 것으로, 실질적으로 각 효소 또는 단백질과 동일하거나 상응하는 활성을 가지는 아미노산 서열의 경우도 본 발명의 범주에 포함될 수 있다.

[0043] 일 구현예에 있어서, 상기 PHB 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물은 슈도모나스속(*Pseudomonas*) 균주일 수 있고, 바람직하게는, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) KT2440일 수 있다.

[0044] 일 구현예에 있어서, 상기 PHB 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물은 에탄올을 기질로 이용하여 폴리하이드록시부티레이트를 생산하는 것일 수 있다.

[0045] 일 구현예에 있어서, 상기 PHB 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물은 폴리하이드록시부티레이트 생산능이 야생형(WT)에 비해 현저히 향상된 것일 수 있다.

[0046] 일 구현예에 있어서, 상기 PHB 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물은 에탄올을 아세트알데하이드(acetaldehyde)로 전환; 아세트알데하이드를 아세틸-CoA(acetyl-coenzyme A)로 전환; 및 아세틸-CoA를 폴리하이드록시부티레이트로 전환;하는 단계를 통해 에탄올을 폴리하이드록시부티레이트로 전환하는 것일 수 있다.

[0048] 또한, 다른 일 측면에서, 본 발명은 상기 PHB 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물을 포함하는 폴리하이드록시부티레이트 생산용 조성물에 관한 것이다.

[0049] 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 기질로서 에탄올을 포함하는 것일 수 있다. 상기 에탄올은 조성물 내에 0.1 내지 1.5 부피%로 포함되는 것일 수 있고, 바람직하게는 0.3 내지 1.3 부피%, 보다 바람직하게는 0.5 내지 1.1 부피% 포함되는 것일 수 있으며, 0.9 내지 1.1 부피% 포함되는 것이 더욱 바람직하다.

[0051] 또한, 다른 일 측면에서, 본 발명은 상기 PHB 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물을 에탄올이 포함된 배지에서 배양하여 전환 반응을 유도하는 단계; 및 상기 배지로부터 폴리하이드록시부티레이트를 회수하는 단계;를 폴리하이드록시부티레이트의 생산 방법에 관한 것이다.

[0052] 본 발명에서 용어 "배양"은 목적하는 세포 또는 조직 등을 인공적으로 조절한 환경 조건에서 성장시키거나 생육하는 것을 의미한다. 상기 환경 조건은 대표적으로 영양소, 온도, 삼투압, pH, 기체 조성, 빛 등이 있으나, 직접적인 영향을 주는 것은 배지이며, 배지는 크게 액체배지와 고체배지로 나뉠 수 있다. 본 발명의 형질전환된 재조합 미생물의 배양은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

[0053] 구체적으로, 상기 배양은 상기 형질전환된 재조합 미생물로부터 목적하는 폴리하이드록시알카노에이트를 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치 공정 또는 주입배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 LB 배지 또는 M9 배지를 사용할 수 있고, 형질전환된 재조합 미생물이 성장하기에 바람직한 범위 내에서 상기 배지에 포함된 성분 또는 이의 함량을 적절히 조절한 배지를 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 형질전환된 재조합 미생물의 배양 온도는 15℃ 내지 45℃, 구체적으로 20℃ 내지 40℃, 보다 구체적으로 25℃내지 35℃일 수 있으며, 에탄올과 재조합 미생물의 원활한 접촉을 위해, 150rpm 내지 1000rpm, 바람직하게는 200rpm 내지 900rpm, 보다 바람직하게는 300rpm 내지 800rpm으로 교반할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0054] 일 구현예에 있어서, 상기 전환 반응은 배양액에 0.1 내지 1.5 부피%의 에탄올을 첨가하여 수행하는 것일 수 있고, 바람직하게는 0.3 내지 1.3 부피%의 에탄올, 보다 바람직하게는 0.5 내지 1.1 부피%의 에탄올을 첨가하여 수행하는 것일 수 있고, 0.9 내지 1.1 부피%의 에탄올을 첨가하여 수행하는 것이 더욱 바람직한 것일 수 있다.

[0055] 일 구현예에 있어서, 상기 전환 반응은 처음 24시간 후, 12시간마다 배지 전제 부피를 기준으로 1 내지 1.1부피%의 에탄올을 첨가하여 수행하는 것일 수 있다.

[0056] 일 구현예에 있어서, 상기 폴리하이드록시부티레이트를 회수하는 단계는 배양 방법에 따라 당업계에 공지된 적합한 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 공지된 폴리하이드록시부티레이트 회수 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별 용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면 HPLC, 이온교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법이 사용

될 수 있다.

[0058] 나아가, 다른 일 측면에서, 본 발명은 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenases, ada); 프로피온알데하이드 탈수소효소(propionaldehyde dehydrogenase, pduP); 글리세롤 탈수효소(glycerol dehydratase, dhaB123+gdrA 및 gdrB); PHA 신타아제(polyhydroxyalkanoate synthase, phaC); 3-케토티올라제(3-ketothiolase, phaA) 및 아세토아세틸-CoA 환원효소(acetoacetyl-CoA reductase, phaB)가 도입 또는 과발현되어 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate, P3HB3HP) 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물에 관한 것이다.

[0059] 본 발명에서 용어 "3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체 (Poly(3-hydroxybytyrate-co-3-hydroxypropionate), P3HB3HP)"는 폴리하이드록시알카노에이트(PHA)의 한 종류로서, 폴리 3-하이드록시부티레이트(PHB)와 폴리 3-하이드록시프로피오네이트(3HP)가 결합된 공중합체인 생분해성 폴리에스터를 의미한다.

[0060] 일 구현예에 있어서, 상기 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenases, ada), 프로피온알데하이드 탈수소효소(propionaldehyde dehydrogenase, pduP)의 정의는 전술한 바와 같다.

[0061] 일 구현예에 있어서, 상기 PHA 신타아제(polyhydroxyalkanoate synthase, phaC)는 3-하이드록시부티릴-CoA를 폴리하이드록시부티레이트로 전환하거나, 3-하이드록시부틸-CoA 및 3-하이드록시프로피오닐-CoA를 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체로 중합하는 촉매작용을 하는 효소일 수 있고, 3-케토티올라제(3-ketothiolase, phaA)는 아세토아세틸-CoA를 3-하이드록시부티릴-CoA로 전환하는 촉매작용을 하는 효소일 수 있으며, 아세토아세틸-CoA 환원효소(acetoacetyl-CoA reductase, phaB)는 아세틸-CoA를 아세토아세틸-CoA로 전환하는 촉매작용을 하는 효소일 수 있다. 구체적으로 상기 PHA 신타아제(polyhydroxyalkanoate synthase); 3-케토티올라제(3-ketothiolase) 및 아세토아세틸-CoA 환원효소(acetoacetyl-CoA reductase)를 코딩하는 유전자인 phaC, phaA 및 phaB는 큐프리아비두스 네카토르(*Cupriavidus necator*) H16 유래일 수 있으며, 각각 서열번호 3, 서열번호 4 및 서열번호 5의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 3, 서열번호 4 및 서열번호 5의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 phaC, phaA 및 phaB 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.

[0062] 일 구현예에 있어서, 상기 글리세롤 탈수효소(glycerol dehydratase, dhaB123+gdrA 및 gdrB)는 글리세롤을 3-하이드록시프로피온알데하이드로 촉매하는 작용을 하는 효소를 의미한다. 상기 글리세롤 탈수효소(glycerol dehydratase)를 코딩하는 유전자인 dhaB123+gdrA 및 gdrB는 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) KCTC 2442 유래일 수 있으며, 구체적으로 각각 서열번호 6 및 서열번호 7의 염기서열로 구성된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 6 및 서열번호 7의 서열과 70% 이상, 구체적으로는 80% 이상, 보다 구체적으로는 90%이상, 보다 더 구체적으로는 95%이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서 실질적으로 글리세롤 탈수효소 활성을 가진 단백질을 발현 가능한 경우, 제한없이 포함될 수 있다.

[0063] 즉, 본 발명의 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체(P3HB3HP) 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물에 있어서, 상기 알데하이드 탈수소효소(ada)는 서열번호 1; 프로피온알데하이드 탈수소효소(pduP)는 서열번호 2; PHA 신타아제(phaC)는 서열번호 3; 3-케토티올라제(phaA)는 서열번호 4; 아세토아세틸-CoA 환원효소(phaB)는 서열번호 5; 글리세롤 탈수효소(dhaB123+gdrA)는 서열번호 6; 및 글리세롤 탈수효소(gdrB)는 서열번호 7;의 염기서열로 이루어진 유전자로 각각 코딩되는 것일 수 있다.

[0064] 상기 언급한 각각의 효소 또는 단백질은 본 발명에서 사용되는 각각의 활성을 나타내는 한, 각 효소 또는 단백질을 구성하는 아미노산 서열의 하나 이상의 위치에서의 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실, 삽입, 첨가 또는 역위된 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 상기 각 효소 또는 단백질의 활성을 나타내는 한, 상기 각 효소 또는 단백질의 아미노산 서열에 대하여, 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 보다 더 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 가지는 것으로, 실질적으로 각 효소 또는 단백질과 동일하거나 상응하는 활성을 가지는 아미노산 서열의 경우도 본 발명의 범주에 포함될 수 있다.

[0066] 일 구현예에 있어서, 상기 P3HB3HP 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물은 슈도모나스속(*Pseudomonas*) 균주일 수 있고, 바람직하게는, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) KT2440일 수 있다.

[0067] 일 구현예에 있어서, 상기 P3HB3HP 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물은 에탄올 및 글리세롤을 공동 기질로 이용하여 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트를 생산하는 것일 수 있다.

[0068] 일 구현예에 있어서, 상기 P3HB3HP 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물은 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 생산능이 야생형(WT)에 비해 현저히 향상된 것일 수 있다.

[0069] 일 구현예에 있어서, 상기 P3HB3HP 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물은 에탄올을 아세트알데하이드로 전환; 아세트알데하이드를 아세틸-CoA로 전환; 및 아세틸-CoA를 3-하이드록시부틸-CoA로 전환;하는 단계; 글리세롤을 3-하이드록시프로피온알데하이드(3-hydroxypropionaldehyde)로 전환; 3-하이드록시프로피온알데하이드를 3-하이드록시프로피오닐-CoA(3-hydroxypropionyl-CoA)로 전환;하는 단계; 및 3-하이드록시부틸-CoA 및 3-하이드록시프로피오닐-CoA를 중합하는 단계;를 통해 에탄올 및 글리세롤로부터 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체를 중합하는 것일 수 있다.

[0070] 일 구현예에 있어서, 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체 생산을 위한 효소 또는 단백질들을 재조합 미생물에 도입 또는 과발현시, 상기 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenases, ada); 프로피온알데하이드 탈수소효소(propionaldehyde dehydrogenase, pduP); PHA 신타아제(polyhydroxyalkanoate synthase, phaC); 3-케토티올라제(3-ketothiolase, phaA) 및 아세토아세틸-CoA 환원효소(acetoacetyl-CoA reductase, phaB)는 에탄올로부터 3HB 생산을 위한 모듈 1의 플라스미드, 글리세롤 탈수효소(glycerol dehydratase, dhaB123+gdrA 및 gdrB)는 글리세롤로부터 3HP를 생산하기 위한 모듈 2의 플라스미드로 각각 제작되어 도입 또는 과발현 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0071] 상기 P3HB3HP는 본 발명의 형질전환된 재조합 미생물의 대사 산물로서, 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명의 일 실시예에서는 *P. putida* KT2440에 상기 P3HB3HP를 합성하기 위한 대사 경로를 도입하고, 상기 균주를 에탄올 및 글리세롤을 공동 탄소원으로 배양하여 생산하였다.

[0073] 또한, 다른 일 측면에서, 본 발명은 상기 P3HB3HP 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물을 포함하는 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체 생산용 조성물에 관한 것이다.

[0074] 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 기질로서 에탄올 및 글리세롤을 포함하는 것일 수 있다. 상기 에탄올은 조성물 내에 0.1 내지 1.5 부피%로 포함되는 것일 수 있고, 바람직하게는 0.3 내지 1.3 부피%, 보다 바람직하게는 0.5 내지 1.1 부피% 포함되는 것일 수 있으며, 0.9 내지 1.1 부피% 포함되는 것이 더욱 바람직하다. 상기 글리세롤은 조성물 내에 0.1 내지 1.5 부피%로 포함되는 것일 수 있고, 바람직하게는 0.3 내지 1.3 부피%, 보다 바람직하게는 0.5 내지 1.1 부피% 포함되는 것일 수 있으며, 0.9 내지 1.1 부피% 포함되는 것이 더욱 바람직하다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체 생산을 위한 최적 에탄올 및 글리세롤 농도는 각각 조성물 전체 부피 기준 1 부피% 및 1 부피%일 수 있다.

[0076] 또한, 다른 일 측면에서, 본 발명은 상기 P3HB3HP 생산능을 가지는 형질전환된 재조합 미생물을 에탄올 및 글리세롤이 포함된 배지에서 배양하여 전환 반응을 유도하는 단계; 및 상기 배지로부터 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체를 회수하는 단계;를 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체의 생산 방법에 관한 것이다.

[0077] 일 구현예에 있어서, 상기 배양 및 전환 반응의 정의는 전술한 바와 같다.

[0078] 일 구현예에 있어서, 상기 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체를 회수하는 단계는 배양 방법에 따라 당업계에 공지된 적합한 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 공지된 3-하이드록시부티레이트-3-하이드록시프로피오네이트 공중합체 회수 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별 용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면 HPLC, 이온교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법이 사용될 수 있다.

[0080] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0082] **실험예 1. 재료 및 방법**

[0083] 1-1. 재료

[0084] 본 발명에서 사용된 박테리아 균주 및 플라스미드는 하기 표 1 및 표 2에 나타내었으며, *P. putida* KT2440(DSMZ 6125)을 생물학적 변환을 위한 숙주 균주로 사용하였다. 알칼리 리그닌, 페룰산 및 기타 화학 물질은 Sigma-Aldrich(미국) 또는 대정(한국)에서 구입했다. *P. putida* KT2440의 성장을 위한 배지로 LB 또는 M9 무기염 배지를 사용하여 30℃에서 배양하였다. M9 미네랄 배지(Helmholtz Munchen) 성분은 다음과 같다: M9 염 용액(10×), Na_2HPO_4(33.7mM), KH_2PO_4(22.0mM), NaCl(8.55mM), NH_4Cl(9.35mM), $MgSO_4$(1mM), $CaCl_2$(0.1mM), 비오틴(1㎍), 티아민(1㎍) 및 10mL 미량 원소 (EDTA(5g/L), $FeCl_3 \cdot H_2O$(0.83g/L), $ZnCl_2$(84mg/L), $CuCl_2 \cdot 2H_2O$(13mg/L), $CoCl_2 \cdot 2H_2O$(10mg/L), H_3BO_3(10mg /L), 및 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$(1.6 mg/L)).

표 1

[0085]

균주 명 (Strains Name)	특징 (Characteristics)	출처 (Source)
Escherichia coli	Host strain for cloning	Invitrogen
Pseudomonas putida KT2440	Wild type, host strain (DSM 6125)	DSMZ
Klebsiella pneumoniae	WT (KCTC 2442)	KCTC
Cupriavidus necator	WT	KCCM
K-pAWP-pTacGFP	*P. putida* KT2440 harboring pAWP89-pTacGFP plasmid	본 발명
K-pBBR1-pTacGFP	*P. putida* KT2440 harboring pBBR1-pTacGFP plasmid	본 발명
K-pBBR1-pAceGFP	*P. putida* KT2440 harboring pBBR1-pAceGFP plasmid	본 발명
K-pBBR1-pGlnGFP	*P. putida* KT2440 harboring pBBR1-pGlnGFP plasmid	본 발명
K-pBBR1-pPhaGFP	*P. putida* KT2440 harboring pBBR1-pPhaGFP plasmid	본 발명
K-pBBR1-pRpoGFP	*P. putida* KT2440 harboring pBBR1-pRpoGFP plasmid	본 발명
K-pBBR1-pAceCAB	*P. putida* KT2440 harboring pBBR1-pAceCAB plasmid	본 발명
K-pBBR1-pTacCAB	*P. putida* KT2440 harboring pBBR1-pTacCAB plasmid	본 발명
K-pBBR1-pTacCABpa	*P. putida* KT2440 harboring pBBR1-pTacCABpa plasmid	본 발명
K-pAWP89-dg	*P. putida* KT2440 harboring pAWP89-dg plasmid	본 발명
K-pBCABpa-pAdg	*P. putida* KT2440 harboring pBBR1-pTacCABpa and pAWP89-dg plasmids	본 발명

표 2

[0086]

플라스미드 명 (Plasmids Name)	특징 (Characteristics)	출처 (Source)
pAWP89	IncP broad-host-range plasmid	Puri AW, et al. Appl Environ Microbiol 81, 1775-1781 (2015)
pBBR1-MCS2	Broad-host-range plasmid compatible with IncP plasmid	Addgene plasmid # 85168
pAWP89-pTacGFP	pAWP89 containing gfp gene driven by pTac promoter	Kovach ME, et al. Gene 166, 175-176 (1995).
pBBR1-pTacGFP	pBBR1-MCS2 containing gfp gene driven by pTac promoter	본 발명
pBBR1-pAceGFP	pBBR1-MCS2 containing gfp gene driven by pAceA promoter	본 발명
pBBR1-pGlnGFP	pBBR1-MCS2 containing gfp gene driven by pGlnA promoter	본 발명
pBBR1-pPhaGFP	pBBR1-MCS2 containing gfp gene driven by pPhaG promoter	본 발명
pBBR1-pRpoGFP	pBBR1-MCS2 containing gfp gene driven by pRpoS promoter	본 발명
pBBR1-pAceCAB	pBBR1-MCS2 containing phaCAB genes from *C. necator* driven by pAceA promoter	본 발명

pBBR1-pTacCAB	pBBR1-MCS2 containing phaCAB genes from *C. necator* driven by pTac promoter	본 발명
pBBR1-pTacCABpa	pBBR1-MCS2 containing phaCAB genes from *C. necator*, pduP from *K. pneumonia*, and ada (aldehyde dehydrogenases) from *Dickeya zeae* driven by pTac promoter	본 발명
pAWP89-dg	pAWP89 containing dhaB123+gdrA and gdrB genes from *K. pseumoniae* KCTC 2442 driven by pTac promoter	본 발명

[0088] 1-2. 내인성 프로모터 프로빙

[0089] 내인성 프로모터(endogenous promoters)는 1% 에탄올에서 배양된 야생형(WT) 균주의 전사 발현 수준을 기반으로 선택되었다. GFP는 리포터 단백질로 사용되었다. 프로모터 프로빙(probing)을 위한 플라스미드를 포함하는 재조합 균주를 1% 에탄올을 함유하는 M9 배지에서 밤새 배양하여 성장시켰다. 상기 배양된 균주의 600nm에서의 광학밀도(OD_{600}) 및 형광 신호를 Synergy HTX 마이크로플레이트 리더(BioTek, Winooski, USA)를 사용하여 측정하였고, 400/30nm에서의 여기 및 505/20nm에서의 방출에 의해 형광 강도를 측정하였다.

[0091] 1-3. 플라스미드 구축(construction)

[0092] 본 발명에서 사용된 모든 프라이머는 Genome Compiler 플랫폼에서 Primer 3 소프트웨어를 사용하여 제작하였으며 Macrogen(한국 서울)에서 합성하여 제작하였고, 이들 각 프라이머의 시퀀스를 하기 표 3에 나타내었다. *P. putida* KT2440의 게놈 DNA는 Wizard® 게놈 DNA 정제 키트(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 분리되었다. PCR은 Lamp Pfu Polymerase(BioFACT, Korea)를 이용하여 수행하였다. Gibson 어셈블리(New England Biolab)를 사용하여 플라스미드 구성을 수행하였다.

표 3

[0093]

프라이머(primer)	프라이머 시퀀스(primer sequence) 5`-> 3`
FWD_gfp-PAWP	ttcacacaggaaacagctATGAGTAAAGGAGAAGAACT
REV_gfp-pAWP	gcatcttcccgacaactaCTATTTGTATAGTTCATCCA
FWD_pAWP89	TAGTTGTCGGGAAGATGCGT
REV_PAWP89	AGCTGTTTCCTGTGTGAATA
FWD_pBBR1-MCS2	TTGTCGCCTTGCGTATAATA
REV_pBBR1-MCS2	CGCGCAATTAACCCTCACTA
FWD_pTac-xx-pBBR1	gagggttaattgcgcgACGGTTCCTGGCCTTTTGCT
REV_pTac-xx-pBBR1	atacgcaaggcgacaagctagcGGACGGCGGCTTTGTTGAAT
FWD_pAceA	gagggttaattgcgcgTCCCAGGCAATTCAAGGCTT
REV_pAceA	GGAAATAAACCTCGTCGCAT
FWD_pGlnA	gagggttaattgcgcgGAGATAAATGCAGAGGCCAG
REV_ pGlnA	GTTGTCCTCCGGATGGTCTA
FWD_pPhaG	gagggttaattgcgcgGCCGTGACAGACAGCCCGTG
REV_ pPhaG	GTCATCGACTCCTGGCGCAA
FWD_pRpoS	gagggttaattgcgcgCCGTTGTACCCAGCCTGTTC
REV_ pRpoS	TGTTATAATCCTTTGCTGAG
FWD_gfp-pTac-pBBR1	tcacacaggaaacagctATGAGTAAAGGAGAAGAACT
REV_gfp-pBBR1	tatacgcaaggcgacaaCTATTTGTATAGTTCATCCA
FWD_gfp-pAceA	gcgacgaggtttatttccATGAGTAAAGGAGAAGAACT
FWD_gfp-pGlnA	ccatccggaggacaacATGAGTAAAGGAGAAGAACT
FWD_gfp-pPhaG	gccaggagtcgatgacATGAGTAAAGGAGAAGAACT
FWD_gfp-RpoS	ctcagcaaaggattataacaATGAGTAAAGGAGAAGAACT
FWD_phaCAB-pAceA-BBR1	gcgacgaggtttatttccATGGCGACCGGCAAAGGCGC
REV_phaCAB-BBR1	ctttgccggtcgccatGGAAATAAACCTCGTCGCAT
FWD_phaCAB-pAWP	ttcacacaggaaacagctATGGCGACCGGCAAAGGCGC
REV_phaCAB-pAWP	gcatcttcccgacaactagaattcTCAGCCCATATGCAGGCCGC
FWD_pduP	ttcacacaggaaacagctATGAATACAGCAGAACTGGA

REV_pduP	tgtgtgaataTTAGCGAATGGAAAAACCGT
FWD_ada	cattcgctaaTATTCACACAGGAAACAGCT
REV_ada	gcatcttcccgacaactaTCAGGCGATACGGAACATAT
FWD_pduP-ada-EcoRI	cgtgatctgatccttccagGAGGTATTCACACAGGAAAC
REV_pduP-ada-EcoRI	aaggatcagatcacgcagTGGAAGGATCAGATCACGCA
FWD_pTac-CABpa-pBBR1	gagggttaattgcgcgACGGTTCCTGGCCTTTTGCT
REV_pTac-CABpa-pBBR1	atacgcaaggcgacaagctagcGGACGGCGGCTTTGTTGAAT
FWD_pduCDE	ttcacacaggaaacagctATGAAAAGATCAAAACGATT
REV_pduCDE	cctcgttaaTTAATTCGCCTGACCGGCCA
FWD_gdrB	ggcgaattaaTTAACGAGGGGACCGTCATG
REV_gdrB	gcatcttcccgacaactaTCAGTTTCTCTCACTTAACG
FWD_dg-nheI	tatcgataccgtcgaccTATTCACACAGGAAACAGCT
REV_dg-nheI	gggtaccgggcccccccGAGCATTACGCTGACTTGAC

[0095] 1-4. 분석 방법

[0096] 세포 광학 밀도(optical density)는 1 cm 경로 길이(path length)의 1.5 ml 큐벳을 사용하여 Beckman 분광 광도계로 600nm에서 측정하였다. 에탄올, 3HP 및 글리세롤은 65℃에서 Aminex HPX-87H 컬럼(Bio-Rad Laboratories, California, USA)이 장착된 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC, Agilent technology, USA)를 통해 분석하였으며, 황산(5mM)을 0.6ml/min의 속도로 이동상으로 사용하였다. 3HP의 분석은 210nm에서 UV 검출기를 사용하여 수행하였고, 에탄올과 글리세롤은 RI 검출기를 사용하여 분석하였다. PHB 및 P3HB3HP는 메탄올 분해법(methanolysis method)을 이용하여 기체 크로마토그래피-질량 분석법(GC-MS)으로 분석하였다. 메탄올 분해 분석은 스크류 캡이 있는 10ml 유리관에 30mg의 동결 건조된 세포에 2ml의 클로로포름 및 5% 황산을 함유하는 메탄올 2ml를 첨가하여 수행하였고, 내부 표준으로 벤조산을 사용하였다. 이어서, 혼합물을 100℃에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 냉각 후, 1mL의 NaCl(1M)을 첨가하여 수성상 및 유기상(아래 상)을 분리하였다. 유기상을 여과하고 다음 순서로 GC-MS에 주입하였다: 주입 포트 온도를 230℃로 설정; 인터페이스 온도를 250℃로 설정; 1mL/min 헬륨 운반 기체 사용; GC 오븐 온도를 4분 동안 60℃로 설정한 다음 8℃/min의 속도로 160℃까지 증가시키고 160℃에서 4분 동안 유지; 및 온도를 15℃/분의 속도로 200℃까지 증가시키고 최종적으로 4분 동안 200℃에서 유지.

[0098] 1-5. 발효

[0099] PHB 생산은 1.5L의 M9 배지가 있는 5L 생물반응기에서 수행하였다. 밤새 seed 배양물을 50 ml 팔콘 튜브에서 준비하였다. 발효는 30℃ 에서 초기 에탄올 농도 1%로 진행하였으며, 교반은 300~800rpm으로 설정하였다. 처음 24시간 후, 12시간마다 10ml의 에탄올을 첨가하였다. pH는 1N HCl 및 1N NH_4OH를 사용하여 자동으로 조절하였다. 샘플을 매일 수집하여 에탄올 소비 및 아세테이트 형성을 분석하였다. 48시간, 72시간, 96시간 및 120시간에 50ml의 배양액을 수집하여 세포를 수확하고 PHB 함량을 분석하였다.

[0101] **실험예 2. *P. putida* KT2440 의 에탄올 산화**

[0102] *P. putida* KT2440 균주의 에탄올 동화 능력(ethanol assimilation capabilities)을 평가하기 위해 예비 에탄올 내성 스크리닝을 수행하였다. 0.2%에서 2% 범위의 에탄올 농도(0.2%, 0.5%, 1%, 1.5% 및 2%)는 *P. putida* KT2440의 성장을 위한 유일한 탄소 및 에너지원으로 사용되었다. 도 2b에 도시된 바와 같이, *P. putida* KT2440은 모든 에탄올 농도에서 성장할 수 있었고, 특히, 0.5% 및 1% 에탄올에서 자란 배양물에서 가장 높은 성장 성능이 관찰되었다. 두 농도에서 배양물의 성장 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 0.5% 및 1% 에탄올에서 성장한 *P. putida KT2440* 의 배양물은 600 nm에서의 광학밀도(OD_{600})는 처음 24시간 후 3.1의 광학 밀도에 도달하였고, 72시간 내지 96시간 사이에 3.63으로 정점에 도달한 것으로 나타났다. 더 높은 에탄올 농도(1.5% 및 2%)에서 자란 배양물에서 감소된 성장률이 관찰되었다. 1.5% 및 2% 에탄올에서 배양한 *P. putida KT2440* 의 가장 높은 OD_{600} 값은 각각 96시간에 2.25 및 1.94로 확인되었다. 0.2% 에탄올에서 배양한 *P. putida* KT2440은

0.5% 및 1% 에탄올에서 배양한 것보다 약간 느린 성장 곡선을 보였다. 이러한 결과는 1.5% 및 2% 에탄올에서 성장한 배양물에서 보이는 기질 억제보다는 기질의 가용성이 낮기 때문일 수 있다. 48시간에 대부분의 배양에서 관찰된 짧은 감소는 대사 모드의 전환 때문일 수 있다. 에탄올의 아세트알데하이드 및 아세테이트로의 전환은 빠르고 효율적이지만, 아세트알데하이드/아세테이트의 아세틸-CoA로의 전환은 세포 조건에 따라 다르다.

[0103] *P. putida* KT2440이 PQQ 의존성 ADH로 인해 에탄올을 고효율로 이용할 수 있는 잠재적 숙주임을 확인하였다.

[0105] **실험예 3. 발현 플라스미드 및 내인성 프로모터 프로빙의 검증**

[0106] pTac 프로모터 및 적색 형광 단백질(dTomato)이 포함된 IncP 기반의 광범위한 숙주 범위 플라스미드 pAWP89(Puri AW, *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* (2015) 81, 1775-1781)를 사용하여 *P. putida* KT2440의 플라스미드 pBBR1-MCS와 비교하여 복제 능력 및 상대적 발현 강도를 조사하였다.

[0107] pTac 프로모터 및 dTomato 리포터 유전자를 pBBR1-MCS에 클로닝한 다음, 이어서, dTomato를 함유하는 플라스미드 pAWP89 및 pBBR1을 *P. putida* KT2440으로 형질전환시켰다. 그 결과, 레드 카나마이신 내성 재조합체(Red kanamycin-resistant recombinants)가 성공적으로 얻어졌으며, 이로부터 pAWP89와 pBBR1이 모두 *P. putida* KT2440에서 관심 유전자를 복제하고 발현할 수 있음을 확인하였다. 그러나 dTomato 발현은 액체 매질에서 불안정해 보였고 색상 변화가 관찰되지 않다. 이에 따라, pTac 프로모터에 의해 구동되는 녹색 형광 단백질(GFP)을 pAWP89 및 pBBR1-MCS2에 구성되도록 하여 각각 플라스미드 pAWP89-pTacGFP 및 pBBR1-pTacGFP를 제작하였다(도 3a). pAWP89-pTacGFP 및 pBBR1-pTacGFP 간의 상대 발현 강도는 형광에 의해 추정되었고 OD_{600} 으로 정규화되었다. 그 결과, 도 3(b)에 도시된 바와 같이, pAWP89-pTacGFP(12952)와 비교하여 pBBR1-pTacGFP(33544)의 정규화된 형광이 거의 2.5배 높은 것으로 나타났으며, 이는 *P. putida* KT2440 에서 관심 유전자의 상대적으로 강한 발현에 대한 pBBR1-MCS2의 잠재력을 나타낸다.

[0108] *P. putida KT2440* 에서 강력한 발현 시스템을 구축하기 위해 GFP의 내인성 프로모터 구동 발현을 조사하였다. 다양한 발현 수준으로 1% 에탄올에서 배양된 *P. putida* KT2440의 내인성 프로모터를 플라스미드 pBBR1-MCS2에 구축하여 리포터 단백질로서 GFP의 발현을 유도하였다. 1% 에탄올에서는 글리옥실레이트 션트의 유전자인 이소시트레이트 리아제(isocitrate lyase, AceC), 글루타민 신타아제(glutamine synthase, GlnA) 및 3-하이드록시데카노일-ACP:CoA 트랜스아실라제(3-hydroxydecanoyl-ACP:CoA transacylase, PhaG)가 높게 발현됨에 따라, 프로모터 pGlnA(FPKM=10521), pPhaG(FPKM=7014), pAceA(FPKM=3392) 및 pRpoS(FPKM=2097)를 선택하여 1% 에탄올에서 *P. putida* KT2440의 상대적 프로모터 강도를 조사하였다(도 3c 및 3d). 도 3(e)는 형광으로 측정하여 OD_{600} 으로 정규화한 상대적인 프로모터 강도를 나타낸 결과로, 프로모터 pAceA는 pGlnA 또는 pPhaG보다 6배 더 높은 정규화 형광으로 가장 높은 상대 발현 강도를 나타낸 반면, pRpoS는 가장 낮은 상대 발현 강도를 나타냈다. 구성적 pTac 프로모터와 비교하여, pBBR1-pAceGFP를 사용하여 측정된 정규화된 형광은 pBBR1-pTacGFP를 사용하여 얻은 것보다 거의 2배 더 높았다. 따라서, 에탄올을 유일한 탄소원으로 사용한 경우에 pAceA 및 pTac가 *P. putida* KT2440 에서 이종 유전자 발현에 대한 높은 가능성을 보임을 확인하였다.

[0110] **실험예 4. *P. putida* KT2440의 에탄올로부터 PHB 생산 경로의 재구성**

[0111] 에탄올은 직접적인 아세틸-CoA 생합성을 위한 유망한 탄소 기질 이며 아세틸-CoA 유래 산물의 생합성을 위한 매우 효율적인 경로를 제공한다. 에탄올 이용은 NADH 및 PQQ-의존성 ADH를 포함한 여러 ADH에 의해 시작된다. PQQ-의존성 ADH를 보유하는 균주 중 *P. putida* KT2440은 유망한 산업 균주이다. 상기 균주는 PQQ 의존성 ADH로서 K_M 값이 각각 85 μM 및 177 μM인 pedE 및 pedH 를 보유한다. 또한 *P. putida* KT2440은 ADH와 ALDH로 주석 처리된 총 14개의 효소에 의해 에탄올에서 높은 세포 밀도로 빠르게 성장할 수 있다. 리그노셀룰로오스와 리그닌의 열화학적 분해를 위한 녹색 용매인 에탄올은 최근 *P. putida* KT2440에서 분해된 리그닌 생성물과 함께 사용되었다. 이러한 접근 방식은 리그닌 분해 산물의 분리 또는 용매 회수 없이 에탄올 및 리그닌 분해 산물을 PHA에 통합할 수 있도록하였으나, PHA 생산은 카르복실화를 통해 아세틸-CoA를 말로닐-CoA로 전환하는 속도 제한 단계로 인해 낮은 수율로 달성되는 문제가 있었다. 따라서 본 발명자들은 *P. putida* KT2440에서 아세틸-CoA를 아세토아테실-CoA로 축합하는 3-케토티올라제(ketothiolase)의 높은 활성으로 PHB 생산을 재구성하면 에탄올로부터 얻어지는 아세틸-CoA의 수율을 상당히 향상시킬 수 있을 것으로 예상하였다.

[0112] *P. putida* KT2440 균주에서 PHB 생산을 가능하게 하기 위해 PHA 합성효소(phaC), 3-케토티올라제(phaA) 및 아

세토아세틸-CoA 환원효소(phaB)를 인코딩하는 phaCAB 오페론을 큐프리아비두스 네카토르(*Cupriavidus necator*) 균주 H16에서 증폭하였다. phaCAB 유전자 단편은 pAceA 프로모터의 제어하에 pBBR1-MCS2로 구축되어 플라스미드 pBBR1-pAceCAB가 생성되었다. 이어서, pBBR1-pAceCAB를 *P. putida* KT2440으로 형질전환 시켜 재조합 균주 KT-pBBR1-pAceCAB를 얻었다. 그러나, 재조합 균주 KT-pBBR1-pAceCAB에서 극적인 성장 결함이 관찰되었다. 성장 결함은 규제 시스템이나 TCA 주기의 억제로 인해 발생할 수 있다. 따라서, pTac 프로모터의 제어하에 phaCAB 유전자 단편을 pBBR1-MCS2로 구축하여 플라스미드 pBBR1-pTacCAB를 생성하였고, 이를 *P. putida* KT2440으로 형질전환 시켜 재조합 균주 KT-pBBR1-pTacCAB를 얻었다.

[0113] 1% 에탄올에서 균주 KT-pBBR1-pTacCAB는 674.97 mg/L의 PHB를 생산하여 40.8% DCW를 생성하였다. PHB의 역가(titer)는 기존 야생형 WT 균주(Nguyen LT *et al.*, *Bioresour. Technol.* (2021) 338, 125563-125572)에서 PHA의 역가보다 4배 더 높았다. WT 균주에서 PHA 합성은 지방산 합성의 속도 제한 효소인 아세틸-CoA 카르복실라제에 의해 촉매되는 아세틸-CoA 카르복실화 단계에서 병목 현상이 발생한다. 따라서, PHB 생성을 증가시키기 위해 phaA는 Claisen 축합 반응을 통해 2개의 아세틸-CoA 분자를 아세토아세틸-CoA로 직접 축합하는 강력한 프로모터 pAceA에 의해 발현되었다. 에탄올로부터 PHB 생성을 향상시키기 위해, 아세트알데하이드를 아세틸-CoA로 직접 전환하는 촉매 작용을 하는 ALDH와 3-프로피온알데하이드를 3-프로피오닐-CoA로 촉매하는 유사한 기능적 효소(*Klebsiella pneumoniae* 유래 pduP)를 phaCAB의 하류에 구축하여 결과적으로 플라스미드 pBBR1-pTacCABpa를 생성하였다. pBBR1-pTacCABpa로 형질전환된 균주 KT-pBBR1-pTacCABpa는 기하급수적인 성장을 보여 처음 24시간 후에 광학 밀도가 8.18±0.32에 도달하였다. 1% 에탄올에서 96시간 배양한 후 PHB(67% DCW)의 역가는 1385±16.5 mg/L로 얻어졌으며, 0.176g PHB/g 에탄올이 생성되었다. 균주 KT-pBBR1-pTacCABpa 의 PHB 역가는 균주 KT-pBBR1-pTacCAB의 PHB 역가보다 2배 높았다(도 4). 결과적으로, 균주 KT-pBBR1-pTacCABpa는 KT-pBBR1-pTacCAB 균주보다 에탄올 소비가 높을 뿐 만 아니라, 에탄올을 거의 완전히 소비하였고, 1.5배 적은 아세테이트를 생성하였다(도 4c). 따라서 *P. putida* KT2440에서 ALDH 및 pduP를 과발현함으로써 에탄올 이용 경로를 개선하여, 에탄올 단독 기질로 사용하여 우수한 광학밀도 및 PHB 생산을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0114] 에탄올 및 포도당(glucose)으로부터 PHB 수율을 비교하기 위해 재조합 균주 KT-pBBR1-pTacCABpa를 0.8% 포도당(8g/L)을 포함하는 M9 배지에서 배양했으며, 이는 대략 1% 에탄올-7.98g/L에 해당된다. 1% 에탄올 및 0.8% 포도당에서 재조합 균주 KT-pBBR1-pTacCABpa의 성장 곡선은 비슷하게 나타났다(도 5a). 0.8% 포도당에서 96시간 배양 후 세포는 8.27±0.36의 OD_{600}에 도달했으며, 이는 1% 에탄올에서 96시간 배양 후보다 약간 더 높다. 마지막으로, 재조합 균주 KT-pBBR1-pTacCABpa는 0.8% 포도당에서 730.24±31.2 mg/L의 PHB(33.06% DCW)를 생산했으며, 이는 1% 에탄올에서 얻은 PHB 역가의 52.71%를 차지하였다(도 5c). 결과적으로, 재조합 균주 KT-pBBR1-pTacCABpa의 에탄올 및 포도당에서의 PHB 생성 비율은 1.897로, 에탄올 및 포도당의 이론적 수율 비율인 1.956과 상응하는 값으로 나타났다.

[0116] **실험예 5. 공중합체 모델 P3HB3HP의 생산**

[0117] *P. putida* KT2440에서 에탄올로부터 scl-PHA 생산 경로의 적용을 확장하기 위해 글리세롤을 전구체로 사용하여 3HP 단량체를 생산하는 적용을 시도하였다. *P. putida* KT2440은 비타민 B12 생합성 경로를 가지고 있기 때문에 글리세롤로부터 3HP 생산을 위한 숙주 균주로서 기본적인 요구 사항을 충족한다. 비타민 B12는 글리세롤의 3HP로의 전환을 촉매하는 글리세롤 탈수효소의 보조인자이다. dhaB123+gdrA 및 gdrB에 의해 암호화된 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)로부터의 글리세롤 탈수효소를 증폭시켜 pAWP89로 구성되게 하여, pAWP89-dg 플라스미드를 생성하였다. 상기 생성된 플라스미드를 *P. putida* KT2440으로 형질전환하여 재조합 균주 KT-pAWP89-dg를 얻었다. 높은 ALDH 활성은 *P. putida* KT2440이 글리세롤 탈수효소(glycerol dehydratase)를 발현함으로써 글리세롤로부터 3HP를 생성할 수 있게 하였다. 균주 KT-pAWP89-dg는 비타민 B12가 없는 환경에서도, 1014.01±81.46 mg/L의 3HP를 생산했으며, 이는 비타민 B12 존재하에 얻어진 3HP 역가의 약 66%에 해당되었다(도 6c 및 6d). pAWP89-dg 플라스미드는 P3HB3HP 공중합체 생산을 위해 사용되었다(도 6a 및 6b).

[0118] 3HP의 생물전환을 위한 *P. putida* KT2440의 대사 공학을 통해, 글리세롤로부터 3HP를 생산하기 위한 pAWP89-dg 플라스미드와 에탄올로부터 3HB 생산을 위한 pBBR1-pTacCABpa 플라스미드를 같이 사용하여 공중합체 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-3-하이드록시프로피오네이트 (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate); P3HB3HP)를 생산할 수 있을 것으로 예상하여, 두 개의 호환 가능한 플라스미드(pAWP89 및 pBBR1-MCS2)를 기반으로 하는 두 개의 플라스미드 시스템을 구축하였으며, 이들을 *P. putida* KT2440에 도입하여 pBBR1-pTacCABpa 및 pAWP89-dg 플라스미드를 보유하는 재조합 균주를 생성하였다(도 6a 및 6b). 이 균주는 2.32%의 3HP mol%로 최대

1325.84 mg/L의 P3HB3HP를 생성하였다(도 6e).

[0119] 따라서 본 발명의 상기 재조합 *P. putida* KT2440 균주는 에탄올과 글리세롤의 동시 소비가 가능하며, 에탄올 및 글리세롤을 공동 기질로 이용하여 공중합체인 P3HB3HP를 생산할 수 있음을 확인하였다.

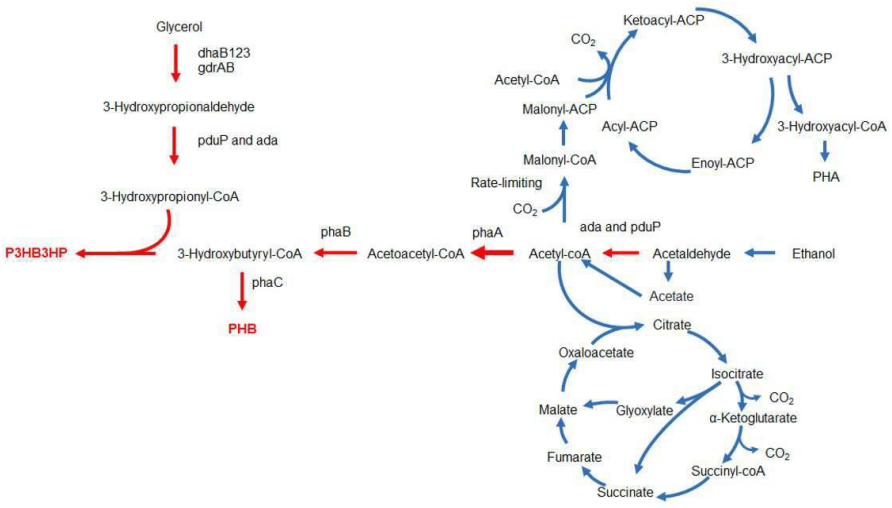
[0121] **실험예 6. PHB 생산을 위한 발효**

[0122] 에탄올로부터 재조합 균주에 의한 PHB 생산을 증가시키기 위해 1.5L 작업 부피를 갖는 2리터 생물 반응기가 발효 공정에 사용되었다. 1%의 에탄올을 함유하는 M9 배지(vol/vol) 및 재조합 KT-pBBR1-pTacCABpa 균주를 생물반응기로 옮겼다. 처음 24시간 배양한 이후, 12시간마다 10ml의 에탄올을 첨가하였다. 48시간 후 배양액 50ml를 채취하여 PHB 생산율을 분석하였다. 도 7에서 볼 수 있듯이 에탄올은 120시간 후 최대 OD_{600}이 43.25±3.25 로 재조합 균주에 의해 빠르게 소모되었다. 생물반응기에서는 아세테이트 형성이 관찰되지 않은 반면 3HB 형성은 120시간 후에 679.18 mg/L의 역가로 관찰되었다. 마지막으로 74.12% DCW 및 0.11g PHB/g 에탄올에 해당하는 최대 9.3±0.56g/L의 PHB가 얻어졌다(도 7).

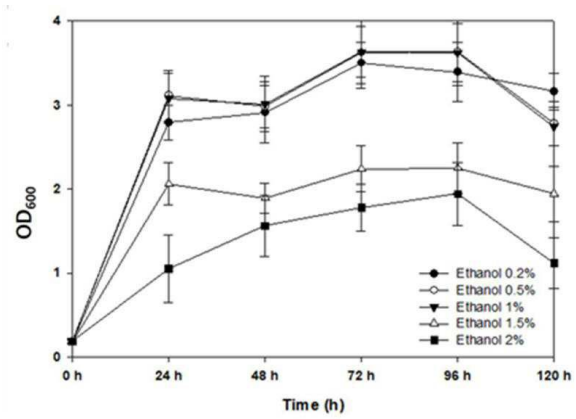
[0124] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

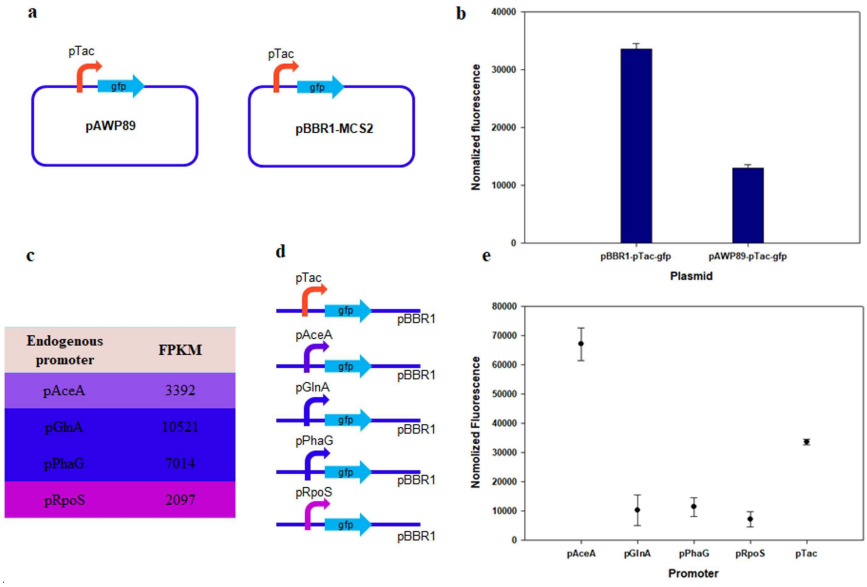
도면1



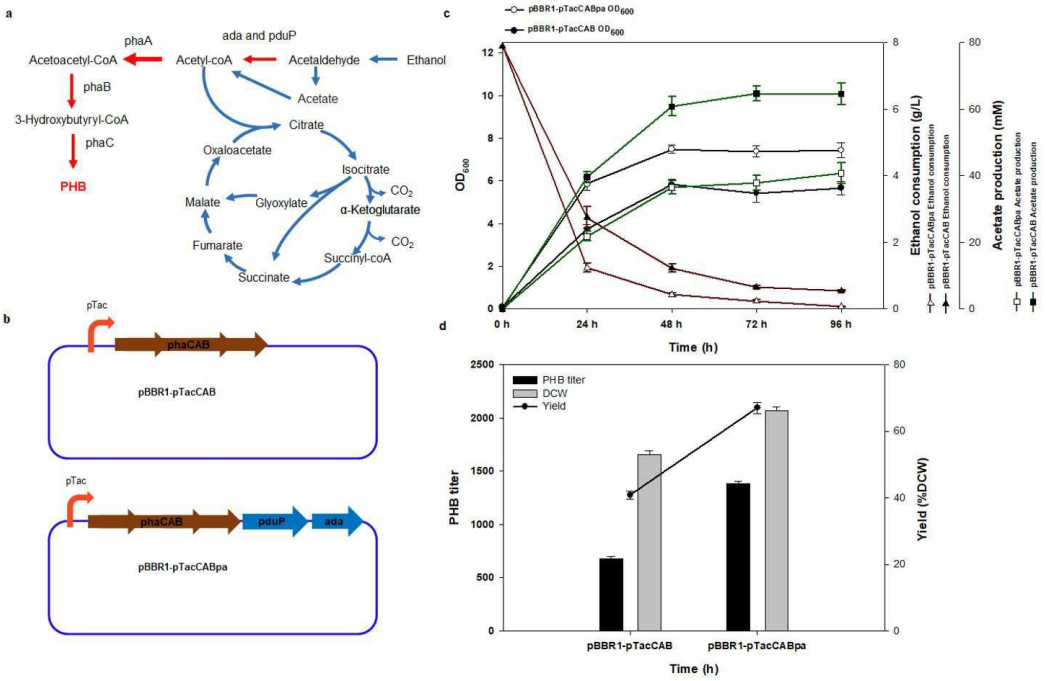
도면2


OD600
Time (h)
0 h
24 h
48 h
72 h
96 h
120 h
Ethanol 0.2%
Ethanol 0.5%
Ethanol 1%
Ethanol 1.5%
Ethanol 2%

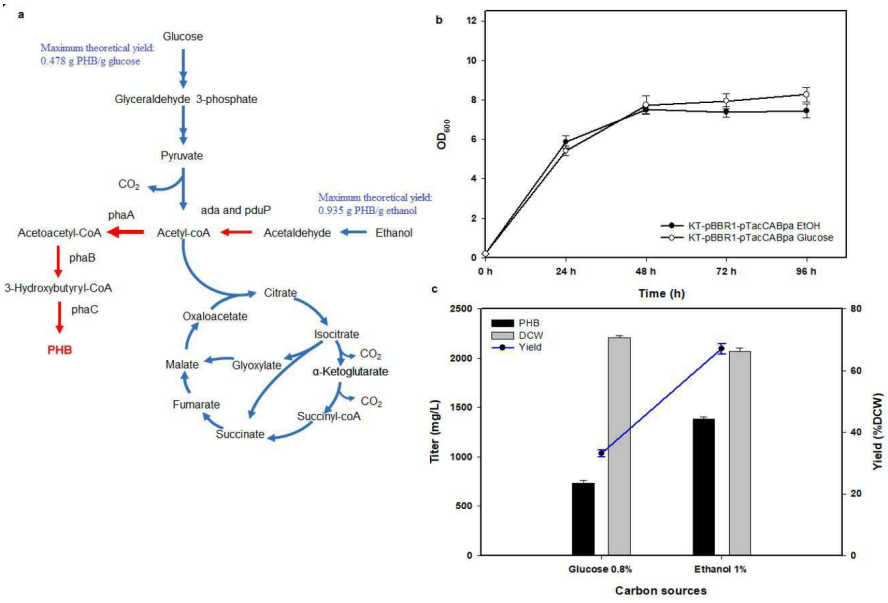
도면3


a
pTac
gfp
pAWP89
pTac
gfp
pBBR1-MCS2
b
Nomalized fluorescence
pBBR1-pTac-gfp
pAWP89-pTac-gfp
Plasmid
c
Endogenous promoter
FPKM
pAceA
3392
pGlnA
10521
pPhaG
7014
pRpoS
2097
d
pTac
pAceA
pGlnA
pPhaG
pRpoS
gfp
pBBR1
e
Nomolized Fluorescence
pAceA
pGlnA
pPhaG
pRpoS
pTac
Promoter

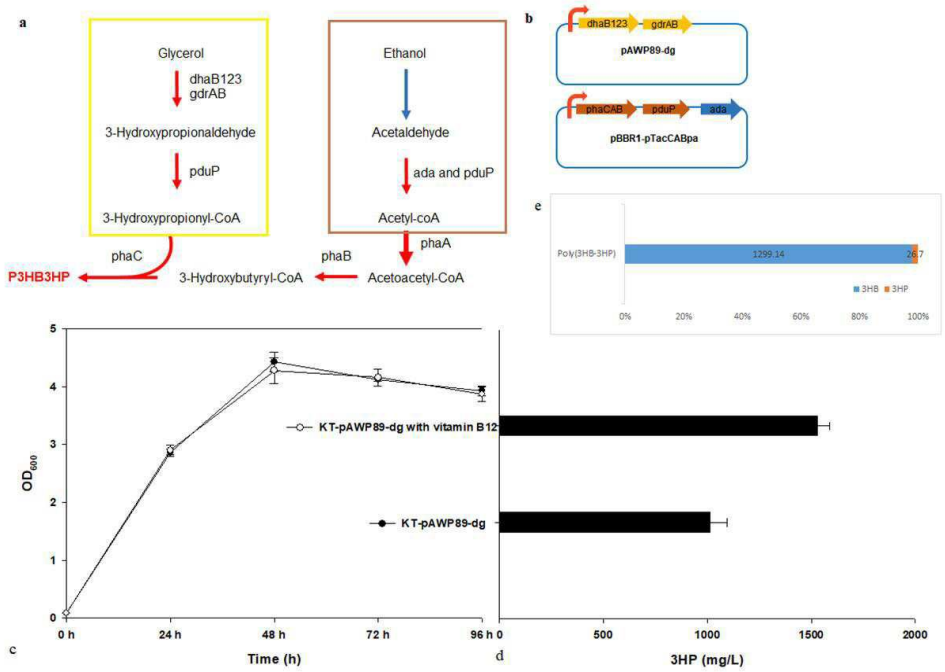
도면4


a
phaA
ada and pduP
Acetoacetyl-CoA
Acetyl-coA
Acetaldehyde
Ethanol
phaB
Acetate
3-Hydroxybutyryl-CoA
Citrate
phaC
Oxaloacetate
Isocitrate
PHB
CO2
Malate
Glyoxylate
α-Ketoglutarate
Fumarate
CO2
Succinyl-coA
Succinate
b
pTac
phaCAB
pBBR1-pTacCAB
pTac
phaCAB
pduP
ada
pBBR1-pTacCABpa
c
pBBR1-pTacCABpa OD600
pBBR1-pTacCAB OD600
OD600
Ethanol consumption (g/L)
Acetate production (mM)
pBBR1-pTacCABpa Ethanol consumption
pBBR1-pTacCAB Ethanol consumption
pBBR1-pTacCABpa Acetate production
pBBR1-pTacCAB Acetate production
0 h
24 h
48 h
72 h
96 h
Time (h)
d
PHB titer
DCW
Yield
PHB titer
Yield (%DCW)
pBBR1-pTacCAB
pBBR1-pTacCABpa
Time (h)

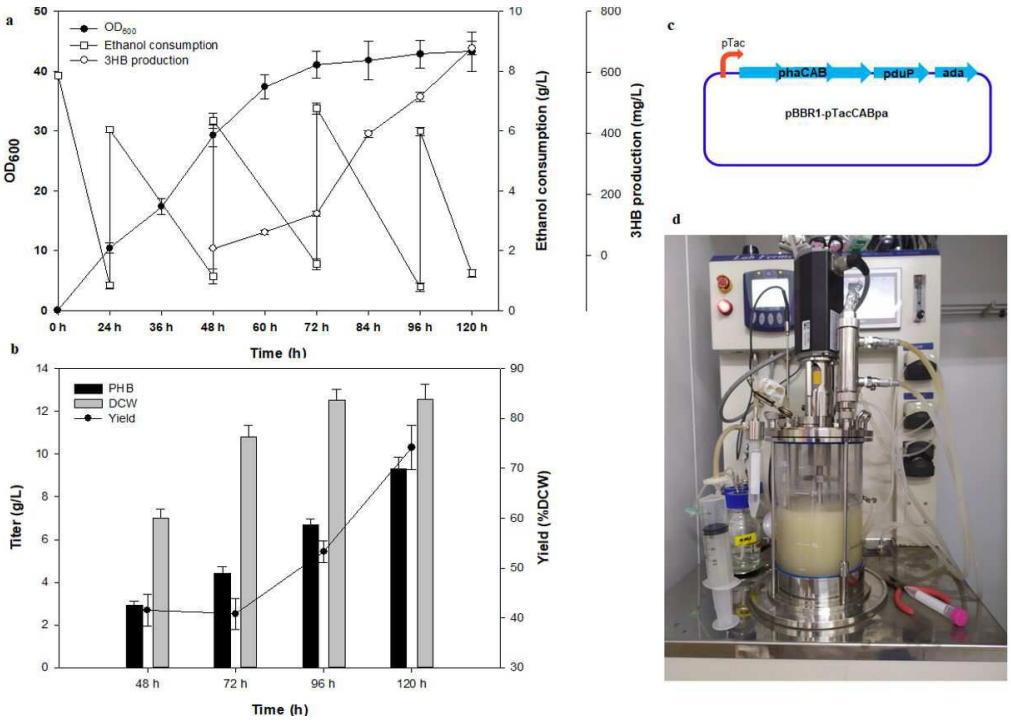
도면5


a
Maximum theoretical yield:
0.478 g PHB/g glucose
Glucose
Glyceraldehyde 3-phosphate
Pyruvate
CO2
Maximum theoretical yield:
0.935 g PHB/g ethanol
ada and pduP
phaA
Acetoacetyl-CoA
Acetyl-coA
Acetaldehyde
Ethanol
phaB
3-Hydroxybutyryl-CoA
Citrate
phaC
Oxaloacetate
Isocitrate
PHB
CO2
Malate
Glyoxylate
α-Ketoglutarate
Fumarate
CO2
Succinyl-coA
Succinate
b
OD600
KT-pBBR1-pTacCABpa EtOH
KT-pBBR1-pTacCABpa Glucose
0 h
24 h
48 h
72 h
96 h
Time (h)
c
PHB
DCW
Yield
Titer (mg/L)
Yield (%DCW)
Glucose 0.8%
Ethanol 1%
Carbon sources

도면6



도면7



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Development of recombinant Pseudomonas putida for direct bio-upgrading of ethanol and glycerol to polyhydroxyalkanoates

<130> PN2204-237

<160> 7

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1380

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ada

<400> 1

atggaacact ccgtgatcga accgactgta ccgatgccca tgcctgcaat gtttgacgca 60

ccgagcggca ttttcgactc gcttgatgac gccgttcagg ccgccgtgta tgcgcaacaa 120

cagttgaaca gcgtcgagct gcgtcaacag gtgattaaag ccattcgggt cgctggcgag 180

cgttatgccc aggtgctggc ggaaatggcc gtggccgaaa ccggcatggg ccgtgtggtc 240

gataaataca tcaaaaacgt gtcgcaggcg cgccatacac cagggatcga atgcctgtcg 300

gcggaagtac tgaccggtga taatgggctg acgctgattg aaaatgcccc ctggggtgtg 360

gttgcgtcag tcaccccgtc aaccaacccg gccgcaaccg ttatcaataa cgccatcagt 420

atgatagccg ccggtaacag cgtggtgttc gccccgcatc cgtcagcgaa aaacgtatcg 480

ctgcgcacca tcagcctgct caataaagcc atcgtcgcca ccggcggccc ggaaaacctg 540

ctggttagcg tttccgaccc taacatcgaa accgcgcaac gcctgtttcg ctaccccggt 600

atcgggctgt tggtggtcac cggcggcgaa gcggtggtgg aagcggcgcg caaacatacc 660

gacaaacggc tgatcgccgc cggggcgggt aacccgccgg tagtggtaga tgaaacggcg 720

gatattccga aagcggctcg cgcgattgtt aaaggtgcct cattcgacaa caacattatc 780

tgtgccgatg agaaggtgct gatcgtggtg gacagtgtgg ctgatgccct actggaagaa 840

atgcaacgca atcatgccgt gctgctcacg ccagcacaaa ctgagcagtt gctaccagca 900

ctgctgagcg acatcgacga gcagggtaaa ggtcgcgtca accgcgacta tgtcggccgt 960

gatgccacga aactggctga agccatcggg cttgaggtca acgaatatac ccgtttactg 1020

ctggctgaaa ccgatgccag ccatccgttt gctgtcaccg aactgatgat gccggtactg 1080

ccggtggtgc gggtgaaaaa cgtggatgag gccattgcgc tggcactcaa actggaaaat 1140

ggctgccgcc acactgctgc gatgcactcc accaatatca ggaacttaaa tcgcatggct 1200

aacgccatca acaccagtat tttcgtcaaa aatggccctt gtatcgccgg gttggggctg 1260

ggtggcgaag gctggacatc gatgaccatc tcgacgccga ccggtgaagg tgtcacctct 1320

gctcgcacct ttgtgcgcct gcgacgctgt gtgctggtgg atatgttccg tatcgcctga 1380

1380

<210> 2

<211> 1389

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pduP

<400> 2

atgaatacag cagaactgga aacccttatc cgcaccatcc tcagtgaaaa gctcgcgccg 60

acgccccctg cccctcagca agagcagggc attttctgcg atgtcggcag cgccatcgac 120

gccgctcatc aggcttttct ccgctatcag cagtgtccgc taaaaacccg cagcgccatt 180

atcagcgccc tgcgggagac gctggccccc gagctggcga cgttggcgga agagagcgcc 240

acggaaaccg gcatgggcaa caaagaagat aaatatctga aaaataaagc cgctcttgaa 300

aacacgccgg gcatagagga tctcactacc agcgccctca ccggcgatgg cgggatggtg 360

ctgtttgagt actcgccgtt cggggttatt ggcgccgtgg cgcccagcac caacccaacg 420

gaaaccatta tcaataacag tatcagcatg ctggcggcgg gtaacagcgt ctatttcagc 480

ccccatcccg gcgcgagaaa ggtctcgttg aagcttatcg ccaggatcga agagatcgcc 540

taccgctgca gcgggatccg taacctggtg gtgaccgttg ccgagccgac ctttgaagcc 600

acccagcaaa tgatgtccca cccggtgatt gccgttctgg ctatcaccgg tggccctggc 660

attgtggcga tgggcatgaa aagcggtaaa aaagtgatcg gcgctggcgc cggcaatccg 720

ccgtgcatcg ttgatgaaac cgccgatctc gtcaaagccg ccgaagatat catcagcggc 780

gccgccttcg attacaacct gccctgtatc gccgaaaaaa gcctgatcgt cgtcgcctcc 840

gtcgctgacc gcctgatcca gcagatgcag gattttgacg cgctgctgtt gagccgacag 900

gaggccgata ccctgcgtgc cgtctgcctg cccgacggcg cggcgaataa aaaactggtc 960

ggtaaaagcc cggctgcgct gctggcggcg gcgggtctcg ccgttccgcc tcgcccccct 1020

cgcctgctga tagccgaggt ggaggcgaac gacccctggg tgacctgcga gcagctgatg 1080

ccggtgctgc cgatcgtcag ggtcgccgac tttgacagcg ccctggcgct ggccctgcgc 1140

gttgaggagg gtctgcacca caccgccatt atgcactcgc agaatgtctc gcggctcaat 1200

ctggcggcac gcaccctgca gacctccatt tttgtcaaaa atggcccgtc ttgcgcggga 1260

atcggcgtcg gcggcgaagg gtttaccacc ttcaccatcg ccacgccaac cggagaaggc 1320

accacctccg cgcggacgtt cgcccgcctg cggcgctgcg tgttgaccaa cggtttttcc 1380

attcgctaa 1389

<210> 3

<211> 1770

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaC

<400> 3

atggcgaccg gcaaaggcgc ggcagcttcc acgcaggaag gcaagtccca accattcaag 60

gtcacgccgg ggccattcga tccagccaca tggctggaat ggtcccgcca gtggcagggc 120

actgaaggca acggccacgc ggccgcgtcc ggcattccgg gcctggatgc gctggcaggc 180

gtcaagatcg cgccggcgca gctgggtgat atccagcagc gctacatgaa ggacttctca 240

gcgctgtggc aggccatggc cgagggcaag gccgaggcca ccggtccgct gcacgaccgg 300

cgcttcgccg gcgacgcatg gcgcaccaac ctcccatatc gcttcgctgc cgcgttctac 360

ctgctcaatg cgcgcgcctt gaccgagctg gccgatgccg tcgaggccga tgccaagacc 420

cgccagcgca tccgcttcgc gatctcgcaa tgggtcgatg cgatgtcgcc cgccaacttc 480

cttgccacca atcccgaggc gcagcgcctg ctgatcgagt cgggcggcga atcgctgcgt 540

gccggcgtgc gcaacatgat ggaagacctg acacgcggca agatctcgca gaccgacgag 600

agcgcgtttg aggtcggccg caatgtcgcg gtgaccgaag gcgccgtggt cttcgagaac 660

gagtacttcc agctgttgca gtacaagccg ctgaccgaca aggtgcacgc gcgcccgctg 720

ctgatggtgc cgccgtgcat caacaagtac tacatcctgg acctgcagcc ggagagctcg 780

ctggtgcgcc atgtggtgga gcagggacat acggtgtttc tggtgtcgtg gcgcaatccg 840

gacgccagca tggccggcag cacctgggac gactacatcg agcacgcggc catccgcgcc 900

atcgaagtcg cgcgcgacat cagcggccag gacaagatca acgtgctcgg cttctgcgtg 960

ggcggcacca ttgtctcgac cgcgctggcg gtgctggccg cgcgcggcga gcacccggcc 1020

gccagcgtca cgctgctgac cacgctgctg gactttgccg acacgggcat cctcgacgtc 1080

tttgtcgacg agggccatgt gcagttgcgc gaggccacgc tgggcggcgg cgccggcgcg 1140

ccgtgcgcgc tgctgcgcgg ccttgagctg gccaatacct tctcgttctt gcgcccgaac 1200

gacctggtgt ggaactacgt ggtcgacaac tacctgaagg gcaacacgcc ggtgccgttc 1260

gacctgctgt tctggaacgg cgacgccacc aacctgccgg ggccgtggta ctgctggtac 1320

ctgcgccaca cctacctgca gaacgagctc aaggtaccgg gcaagctgac cgtgtgcggc 1380

gtgccggtgg acctggccag catcgacgtg ccgacctata tctacggctc gcgcgaagac 1440

catatcgtgc cgtggaccgc ggcctatgcc tcgaccgcgc tgctggcgaa caagctgcgc 1500

ttcgtgctgg gtgcgtcggg ccatatcgcc ggtgtgatca acccgccggc caagaacaag 1560

cgcagccact ggactaacga tgcgctgccg gagtcgccgc agcaatggct ggccggcgcc 1620

atcgagcatc acggcagctg gtggccggac tggaccgcat ggctggccgg gcaggccggc 1680

gcgaaacgcg ccgcgcccgc caactatggc aatgcgcgct atcgcgcaat cgaacccgcg 1740

cctgggcgat acgtcaaagc caaggcatga 1770

<210> 4

<211> 1182

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaA

<400> 4

atgactgacg ttgtcatcgt atccgccgcc cgcaccgcgg tcggcaagtt tggcggctcg 60

ctggccaaga tcccggcacc ggaactgggt gccgtggtca tcaaggccgc gctggagcgc 120

gccggcgtca agccggagca ggtgagcgaa gtcatcatgg gccaggtgct gaccgccggt 180

tcgggccaga accccgcacg ccaggccgcg atcaaggccg gcctgccggc gatggtgccg 240

gccatgacca tcaacaaggt gtgcggctcg ggcctgaagg ccgtgatgct ggccgccaac 300

gcgatcatgg cgggcgacgc cgagatcgtg gtggccggcg gccaggaaaa catgagcgcc 360

gccccgcacg tgctgccggg ctcgcgcgat ggtttccgca tgggcgatgc caagctggtc 420

gacaccatga tcgtcgacgg cctgtgggac gtgtacaacc agtaccacat gggcatcacc 480

gccgagaacg tggccaagga atacggcatc acacgcgagg cgcaggatga gttcgccgtc 540

ggctcgcaga acaaggccga agccgcgcag aaggccggca agtttgacga agagatcgtc 600

ccggtgctga tcccgcagcg caagggcgac ccggtggcct tcaagaccga cgagttcgtg 660

cgccagggcg ccacgctgga cagcatgtcc ggcctcaagc ccgccttcga caaggccggc 720

acggtgaccg cggccaacgc ctcgggcctg aacgacggcg ccgccgcggt ggtggtgatg 780

tcggcggcca aggccaagga actgggcctg accccgctgg ccacgatcaa gagctatgcc 840

aacgccggtg tcgatcccaa ggtgatgggc atgggcccgg tgccggcctc caagcgcgcc 900

ctgtcgcgcg ccgagtggac cccgcaagac ctggacctga tggagatcaa cgaggccttt 960

gccgcgcagg cgctggcggt gcaccagcag atgggctggg acacctccaa ggtcaatgtg 1020

aacggcggcg ccatcgccat cggccacccg atcggcgcgt cgggctgccg tatcctggtg 1080

acgctgctgc acgagatgaa gcgccgtgac gcgaagaagg gcctggcctc gctgtgcatc 1140

ggcggcggca tgggcgtggc gctggcagtc gagcgcaaat aa 1182

<210> 5

<211> 741

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> phaB

<400> 5

atgactcagc gcattgcgta tgtgaccggc ggcatgggtg gtatcggaac cgccatttgc 60

cagcggctgg ccaaggatgg ctttcgtgtg gtggccggtt gcggccccaa ctcgccgcgc 120

cgcgaaaagt ggctggagca gcagaaggcc ctgggcttcg atttcattgc ctcggaaggc 180

aatgtggctg actgggactc gaccaagacc gcattcgaca aggtcaagtc cgaggtcggc 240

gaggttgatg tgctgatcaa caacgccggt atcacccgcg acgtggtgtt ccgcaagatg 300

acccgcgccg actgggatgc ggtgatcgac accaacctga cctcgctgtt caacgtcacc 360

aagcaggtga tcgacggcat ggccgaccgt ggctggggcc gcatcgtcaa catctcgtcg 420

gtgaacgggc agaagggcca gttcggccag accaactact ccaccgccaa ggccggcctg 480

catggcttca ccatggcact ggcgcaggaa gtggcgacca agggcgtgac cgtcaacacg 540

gtctctccgg gctatatcgc caccgacatg gtcaaggcga tccgccagga cgtgctcgac 600

aagatcgtcg cgacgatccc ggtcaagcgc ctgggcctgc cggaagagat cgcctcgatc 660

tgcgcctggt tgtcgtcgga ggagtccggt ttctcgaccg gcgccgactt ctcgctcaac 720

ggcggcctgc atatgggctg a 741

<210> 6

<211> 4529

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> dhaB123+gdrA

<400> 6

atgaaaagat caaaacgatt tgcagtactg gcccagcgcc ccgtcaatca ggacgggctg 60

attggcgagt ggcctgaaga ggggctgatc gccatggaca gccccctttga cccggtctct 120

tcagtaaaag tggacaacgg tctgatcgtc gagctggacg gcaaacgccg ggaccagttt 180

gacatgatcg accgatttat cgccgattac gcgatcaacg ttgagcgcac agagcaggca 240

atgcgcctgg aggcggtgga aatagcccgc atgctggtgg atattcacgt cagtcgggag 300

gagatcattg ccatcactac cgccatcacg ccggccaaag cggtcgaggt gatggcgcag 360

atgaacgtgg tggagatgat gatggcgctg cagaagatgc gtgcccgccg gacccccctcc 420

aaccagtgcc acgtcaccaa tctcaaagat aatccggtgc agattgctgc tgacgccgcc 480

gaggccggga tccgcggctt ctcagaacag gagaccacgg tcggtatcgc gcgctatgcg 540

ccgtttaacg ccctggcgct gttggtcggt tcgcagtgcg gccgccccgg cgttttgacg 600

cagtgctcgg tggaagaggc caccgagctg gagctgggca tgcgtggctt aaccagctac 660

gccgagacgg tgtcggtcta cggcaccgaa gcggtattta ccgacggcga tgatactccg 720

tggtcaaagg cgttcctcgc ctcggcctac gcctcccgcg ggttgaaaat gcgctacacc 780

tccggcaccg gatccgaagc gctgatgggc tattcggaga gcaagtcgat gctctacctc 840

gaatcgcgct gcatcttcat taccaaaggc gccggggttc aggggctgca aaacggcgcg 900

gtgagctgta tcggcatgac cggcgctgtg ccgtcgggca ttcgggcggt gctggcggaa 960

aacctgatcg cctctatgct cgacctcgaa gtggcgtccg ccaacgacca gactttctcc 1020

cactcggata ttcgccgcac cgcgcgcacc ctgatgcaga tgctgccggg caccgacttt 1080

attttctccg gctacagcgc ggtgccgaac tacgacaaca tgttcgccgg ctcgaacttc 1140

gatgcggaag attttgatga ttacaacatc ctgcagcgtg acctgatggt tgacggcggc 1200

ctgcgtccgg tgaccgaggc ggaaaccatt gccattcgcc agaaagcggc gcgggcgatc 1260

caggcggttt tccgcgagct ggggctgccg ccaatcgccg acgaggaggt ggaggccgcc 1320

acctacgcgc acggtagcaa cgagatgccg ccgcgtaacg tggtggagga tctgagtgcg 1380

gtggaagaga tgatgaagcg caacatcacc ggcctcgata ttgtcggcgc gctgagccgc 1440

agcggctttg aggatatcgc cagcaatatt ctcaatatgc tgcgccagcg ggtcaccggc 1500

gattacctgc agacctcggc cattctcgat cggcagttcg aggtggtgag tgcggtcaac 1560

gacatcaatg actatcaggg gccgggcacc ggctatcgca tctctgccga acgctgggcg 1620

gagatcaaaa atattccggg cgtggttcag cccgacacca ttgaataagg cggtattcct 1680

gtgcaacaga caacccaaat tcagccctct tttaccctga aaacccgcga gggcggggta 1740

gcttctgccg atgaacgcgc cgatgaagtg gtgatcggcg tcggccctgc cttcgataaa 1800

caccagcatc acactctgat cgatatgccc catggcgcga tcctcaaaga gctgattgcc 1860

ggggtggaag aagaggggct tcacgcccgg gtggtgcgca ttctgcgcac gtccgacgtc 1920

tcctttatgg cctgggatgc ggccaacctg agcggctcgg ggatcggcat cggtatccag 1980

tcgaagggga ccacggtcat ccatcagcgc gatctgctgc cgctcagcaa cctggagctg 2040

ttctcccagg cgccgctgct gacgctggaa acctaccggc agattggcaa aaacgccgcg 2100

cgctatgcgc gcaaagagtc accttcgccg gtgccggtgg tgaacgatca gatggtgcgg 2160

ccgaaattta tggccaaagc cgcgctattt catatcaaag agaccaaaca tgtggtgcag 2220

gacgccgagc ccgtcaccct gcacgtcgac ttagtaaggg agtgaccatg agcgagaaaa 2280

ccatgcgcgt gcaggattat ccgttagcca cccgctgccc ggagcatatc ctgacgccta 2340

ccggcaaacc attgaccgat attaccctcg agaaggtgct ctctggcgag gtgggcccgc 2400

aggatgtgcg gatctcctgc cagacccttg agtaccaggc gcagattgcc gagcagatgc 2460
agcgccatgc ggtggcgcgc aatttccgcc gcgcggcgga gcttatcgcc attcctgacg 2520
agcgcattct ggctatctat aacgcgctgc gcccgttccg ctcctcgcag gcggagctgc 2580
tggcgatcgc cgacgagctg gagcacacct ggcatgcgac agtgaatgcc gcctttgtcc 2640
gggagtcggc ggaagtgtat cagcagcggc ataagctgcg taaaggaagc taagcggagg 2700
tcagcatgcc gttaatagcc gggattgata tcggcaacgc caccaccgag gtggcgctgg 2760
cgtccgacga cccgcaggcg agggcgtttg ttgccagcgg gatcgtcgcg acgacgggca 2820

tgaaagggac gcgggacaat atcgccggga ccctcgccgc gctggagcag gccctggcga 2880
aaacaccgtg gtcgatgagc gatgtctctc gcatctatct taacgaagcc gcgccggtga 2940
ttggcgatgt ggcgatggag accatcaccg agaccattat caccgaatcg accatgatcg 3000
gtcataaccc gcagacgccg ggcggggtgg gcgttggcgt ggggacgact atcgccctcg 3060
ggcggctggc gacgctgccg gcggcgcagt atgccgaggg gtggatcgta ctgattgacg 3120
acgccgtcga tttccttgac gccgtgtggt ggctcaatga ggcgctcgac cgggggatca 3180
acgtggtggc ggcgatcctc aaaaaggacg acggcgtgct ggtgaacaac cgcctgcgta 3240

aaaccctgcc ggtggtagat gaagtgacgc tgctggagca ggtccccgag ggggtaatgg 3300
cggcggtgga agtggccgcg ccgggccagg tggtgcggat cctgtcgaat ccctacggga 3360
tcgccacctt cttcgggcta agcccggaag agacccaggc catcgtcccc atcgcccgcg 3420
ccctgattgg caaccgttca gcggtggtgc tcaagacccc gcaggggat gtgcagtcgc 3480
gggtgatccc ggcgggcaac ctctacatta gcggcgaaaa gcgccgcgga gaggccgatg 3540
tcgccgaggg cgcggaagcc atcatgcagg cgatgagcgc ctgcgctccg gtacgcgaca 3600
tccgcggcga accgggcact cacgccggcg gcatgcttga gcgggtgcgc aaggtaatgg 3660

cgtccctgac cgaccatgag atgagcgcga tatacatcca ggatctgctg gcggtggata 3720
cgtttattcc gcgcaaggtg cagggcggga tggccggcga gtgcgccatg gaaaatgccg 3780
tcgggatggc ggcgatggtg aaagcggatc gtctgcaaat gcaggttatc gcccgcgaac 3840
tgagcgcccg actgcagacc gaggtggtgg tgggcggcgt ggaggccaac atggccatcg 3900
ccggggcgtt aaccactccc ggctgtgcgg cgccgctggc gatcctcgac ctcggcgccg 3960
gctcgacgga tgcggcgatc gtcaacgcgg aggggcagat aacggcggtc catctcgccg 4020
gggcggggaa tatggtcagc ctgttgatta aaaccgagct gggcctcgag gatctttcgc 4080

tggcggaagc gataaaaaaa tacccgctgg ccaaagtgga aagcctgttc agtattcgtc 4140

acgagaatgg cgcggtggag ttctttcggg aagccctcag cccggcggtg ttcgccaaag 4200

tggtgtacat caaggagggc gaactggtgc cgatcgataa cgccagcccg ctggaaaaaa 4260

ttcgtctcgt gcgccggcag gcgaaagaga aagtgtttgt caccaactgc ctgcgcgcgc 4320

tgcgccaggt ctcacccggc ggttccattc gcgatatcgc ctttgtggtg ctggtgggcg 4380

gctcatcgct ggactttgag atcccgcagc ttatcacgga agccttgtcg cactatggcg 4440

tggtcgccgg gcagggcaat attcggggaa cagaagggcc gcgcaatgcg gtcgccaccg 4500

ggctgctact ggccggtcag gcgaattaa 4529

<210> 7

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gdrB

<400> 7

atgtcgcttt caccgccagg cgtacgcctg ttttacgatc cgcgcgggca ccatgccggc 60

gccatcaatg agctgtgctg ggggctggag gagcaggggg tcccctgcca gaccataacc 120

tatgacggag gcggtgacgc cgctgcgctg ggcgccctgg cggccagaag ctcgcccctg 180

cgggtgggta ttgggctcag cgcgtccggc gagatagccc tcactcatgc ccagctgccg 240

gcggacgcgc cgctggctac cggacacgtc accgatagcg acgatcatct gcgtacgctc 300

ggcgccaacg ccgggcagct ggttaaagtc ctgccgttaa gtgagagaaa ctga 354